



Correspondence  
Patent Office  
European Patent  
Office  
Office of the  
President of the  
European Patent  
Office

Description of DE1152396	Print	Copy	Contact Us	Close
--------------------------	-------	------	------------	-------

## Result Page

Notice: This translation is produced by an automated process; it is intended only to make the technical content of the original document sufficiently clear in the target language. This service is not a replacement for professional translation services. The esp@cenet® Terms and Conditions of use are also applicable to the use of the translation tool and the results derived therefrom.

Method to the preparation of sodium salts blood clotting-more inhibitive Dextran-sulfate more a reester  
The invention has the preparation of sulfuric acid esters of the Carboxyalkylcarbonsäure dextrane, like Carboxymethyl-, Carboxyethyl- and Carboxypropyldextran to the object, which exhibit strong heparinoid effect with a considerable low rem sulphur content as analogue sulfuric acid esters.

It is known that Polysaccharid Polyschwefelsäureester possess blood clotting-inhibitive effect (z. B. German patent specifications 954592 and 970,763).

Furthermore it is known that most of these fabrics are so toxic that it therapeutic not used to become to be able (Karrer et. aluminium Helv. Chim. Acta 27 (1944), S. 1422 FF.).

After winter stone (A. Winterstein, Thromb.

Diath. haem. Volume. 2, No. 5/6 [1958], S. 428 FF.) is a Polysaccharid Polyschwefelsäureester around so effective, per high its molecular weight (coal hydrate chain) and per high its sulphur content is. The toxicity increased itself itself with synthetic preparations analogue: The per high molecular weight and the per high sulphur content, the the toxic preparation. At experiments, the toxicity was not missing by keeping a certain reducing relative low molecular weight range. Such methods are z. B. Subject-matter of the German patent specifications 954592 and 970,763, whereby certain methodical measures a molecular weight of the dextran sulfate of preferably 7500 achieved becomes.

At the cellulose it was found that the toxicity of its sulfuric acid esters can become by introduction from Carboxymethylgruppen and p-Oxyäthylgruppen reduced (Swiss patent specification 235,956).

All these methods common the tendency is to ensure the heparinoid effectiveness by keeping an optimum sulphur content and the toxicity connected thereby by other measures, i.e. reduction of the molecular weight or introduction of Carboxymethyl- and/or. To reduce p-Oxy groups of ethyls.

Although the small inhibitive effect of neutral polysaccharides on the coagulation and its possible gain by other acidic groups than SO<sub>3</sub>H groups found so far in the connection interesting here still no attention. From the application use of clinical dextran, particularly with post office-operative indications, it is become known that the bleeding time remarkable-proves extended becomes (And. Jacobäus, Acta med. Scand. Suppl. 322 [1957], S. 93). The appearance is sionslösungen characteristic for Dextran infu.

With the examination of this phenomenon it was surprisingly found that it becomes increased by introduction of Carboxyalkylgruppen into the Dextranmolekül.

With the combination of this effect with the actual known blood clotting-inhibitive effect from dextran sulfates found became that invention exercises an equivalent strong heparinoid effectiveness in accordance with prepared Carboxyalkyldextran Polyschwefelsäureester with a substantial lower sulphur content than analogue prepared Dextranpolyschwefelsäureester.

Thus a not known path is walked on to the preparation by Polysaccharid Polyschwefelsäureestern with heparinoid effect. In specific cases of the dextran the sulfur-contained component, the SO<sub>3</sub>H-Gruppe substantial can be reduced and thus to it attributed toxic effect.

The loss at coagulate-inhibitive effectiveness, connected thereby, leaves itself by introduction of acidic groups, how Carboxymethyl-, Carboxyethylund Carboxypropylgruppen to adjust.

In the image results of this substitution of SO<sub>3</sub>H-Gruppen are shown by acidic groups regarding the Recalsifizierungszeit at the human plasma. It acts with this comparison around two groups of derivatives. The two groups become in each case from the same starting materials (dextran) prepared. With the first group high-molecular dextran (middle molecular weight 7,000) became, with the second group low molecular dextran (average molecular weight 30,000) used. It comes out from the curves clearer that the loss at sulphur by the introduction of the acidic Carboxymethylgruppen compensated and/or. one overcompensates. With the first group the Carboxymethyldextransulfat 34.9 contains 0/0 sulphur less than the corresponding dextran sulfate; with the second group the Carboxymethyldextran sulfate contains 33.7 0/o sulphur less than the corresponding dextran sulfate. The degree of substitution flat steel bar (for COOH groups) lies with the first Carboxymethyldextransulfat with 0,471, with the second Carboxymethyldextransulfat with 0,503. Analogue results were found with the measurement of the Thrombinzeit. All these products proved as not toxic. The sulphur content prepared of the according to invention preparations lies at least around a third low as that of the known effective preparations.

There are two paths to the preparation of the procedure products. - One can accomplish the Carboxyalkylierung of the dextran and sulphate subsequent; in addition, the reverse path can be walked on, which is called that one only

sulphonating and then the Carboxymethylierung accomplishes.

#### Example 1

##### Preparation of Carboxymethyldextran-sulfat

Sodium A) 200 g Dextran (average molecular weight 000) is touched with 630 ml distilled water. Then 630 ml 400/oige become sodium hydroxide solution added and so long agitated, until itself the dextran has completely dissolved. Afterwards bottom agitations 300 by portion g mono chlorine acetic acid are registered. The temperature of the reaction mixture may not rise thereby over 200 C. One leaves the approach untouched over night and precipitates then with methanol the Carboxymethyldextran sodium. The product becomes purified by multiple falling down. One receives 255 g of the sodium salt with a degree of substitution from 0,471. b) 800 ml absolute pyridine bottom emotion and cooling with methanol carbonic acid 180 ml chlorosulfonic acid dropped reach. Local over hit tongues, recognizable by discoloration of the formed Pyridiniumsalze, become avoided. After removal of the cooling bath the excreted Pyridiniumsalze becomes by heating on 60 to 700 C to a large extent in solution brought. Then 120 g become of the. dried, fine pulverized Carboxymethyldextran sodium bottom agitation registered. The temperature is maintained now on 75 to 800 C brought and bottom agitations 4 hours. One leaves the reaction mixture untouched over night at room temperature. Afterwards the reaction mass is stirred into 1 l ice water. The Pyridiniumsalze becomes by addition of 400/oiger sodium hydroxide solution decomposed. The deposited pyridine separated, the sodium salt of the Carboxymethyldextran-sulfats with \* top methanol pleases, multiple umgefällt and then subjected to the dialysis. The dialysate becomes with 40 to 500 C in the vacuum up to syrup eyes the consistency evaporated.

Syrup eye product is cut up if necessary stirred into methanol, bottom methanols, the dried subsequent washed with acetone and ether and. Yield at sodium salt: 160 G. The sulphur content amounts to 10.8 ozone related to the sodium salt.

#### Example 2

##### Preparation of Carboxymethyldextran-sulfat

Sodium A) 200 g Dextran (average molecular weight 75,000) are touched with 630ml distilled water.

Then 630 ml 400/oige become sodium hydroxide solution added and so long agitated, until itself all dextran has dissolved. Afterwards 300 by portion g mono chlorine acetic acid are registered. The temperature of the reaction mixture may not rise thereby over 200 C.

One leaves the approach untouched 3 days at room temperature and precipitates then the formed Carboxymethyldextran sodium with methanol. The product becomes purified by multiple falling down. One receives 360 g of the sodium salt with a degree of substitution from 0,693. b) From 800 ml absolute pyridine and 180 ml chlorosulfonic acid becomes analogue example 1 the Pyridiniumsulfurierungsgemisch prepared. Into the Pyridiniumsalze solved to a large extent with 60 to 700 C 120 g of the above dried and fine pulverized Carboxymethyldextran sodium become introduced and 4 hours with 75 to 800 C sulfurized. The work up of the reaction product as well as its purification made analogue example 1. One receives 150 g of the sodium salt with a sulphur content from 10,4 O/o.

#### Example 3

##### Preparation of Carboxymethyldextran-sulfat

Sodium A) 200 g Dextran (average molecular weight 30000) are touched with 630ml distilled water.

Then 630 ml 400/oige become sodium hydroxide solution added and up to the solution of the dextran agitated. After itself all dextran has dissolved, 300 g mono chlorine acetic acid are registered by portion, whereby the temperature of the reaction mixture may not rise over 200 C. One leaves the approach untouched over night, precipitates the formed Carboxymethyldextran sodium with methanol and cleans it by multiple falling down. One receives 260 g of the sodium salt with a degree of substitution from 0,560. b) From 800 ml absolute pyridine and 180 ml chlorosulfonic acid becomes analogue example 1 the Pyridiniumsulfurierungsgemisch prepared. Into the Pyridiniumsalze brought with 60 to 700 C in solution 120 g of the above dried and fine pulverized Carboxymethyldextran sodium are to a large extent registered and 4 hours with 75 to 800 C sulfurized. The work up of the reaction product made analogue example 1. One receives 130 g of the sodium salt with a sulphur content from 10,76 O/o.

#### Example 4

##### Preparation of Carboxypropyldextran-sulfat

Sodium A) 200 g Dextran (average molecular weight 13,000) with 644 ml distilled water are touched and with 644 ml 400/oiger sodium hydroxide solution offset. After the dextran bottom agitation became complete brought in solution, 578 g 12-Brombuttersäure were registered by portion. The temperature of the reaction mixture became on bottom 200 C held. One leaves the approach untouched a day and precipitates the formed Carboxymethyldextran sodium with methanol and cleans it by multiple falling down. Yield: 110 G. b) From 665 ml absolute pyridine and 150 ml Chlorosulfonic acid became analogue example 1 the Pyridiniumsulfurierungsgemisch prepared. Into the Pyr brought with 60 to 703 C in solution idiumsalze were to a large extent stirred 100 g of the dried and fine pulverized Carboxypropyldextran sodium and subsequent 4 hours with 75 to 800 C sulfurized.

The work up of the reaction mixture as well as its purification made analogue example 1. One receives 60 g of the sodium salt with a sulphur content from 11,3 /o.



# AUSLEGESCHRIFT 1 152 396

V 17942 IVb/12 o

ANMELDETAG: 26. JANUAR 1960

BEKANNTMACHUNG

DER ANMELDUNG

UND AUSGABE DER

AUSLEGESCHRIFT: 8. AUGUST 1963

## 1

Die Erfindung hat die Herstellung von Schwefelsäureestern der Carboxyalkylcarbonsäuredextrane, wie Carboxymethyl-, Carboxyäthyl- und Carboxypropyldextran zum Ziel, die bei einem beträchtlich niedrigerem Schwefelgehalt als analoge Schwefelsäureester starke heparinoide Wirkung aufweisen.

Es ist bekannt, daß Polysaccharid-Polyschwefelsäureester blutgerinnungshemmende Wirkung besitzen (z. B. deutsche Patentschriften 954 592 und 970 763). Es ist ferner bekannt, daß die meisten dieser Stoffe so toxisch sind, daß sie therapeutisch nicht verwendet werden können (Karrer et. al. *Helv. Chim. Acta* 27 (1944), S. 1422 ff.).

Nach Winterstein (A. Winterstein, *Thromb. Diath. haem.* Vol. 2, Nr. 5/6 [1958], S. 428 ff.) ist ein Polysaccharid-Polyschwefelsäureester um so wirksamer, je höher sein Molekulargewicht (Kohlenhydratkette) und je höher sein Schwefelgehalt ist. Die Toxizität erhöht sich bei synthetischen Präparaten analog: Je höher das Molekulargewicht und je höher der Schwefelgehalt, desto toxischer das Präparat. Es hat nicht an Versuchen gefehlt, die Toxizität durch Einhalten eines bestimmten, relativ niedrigen Molekulargewichtsbereiches zu verringern. Derartige Verfahren sind z. B. Gegenstand der deutschen Patentschriften 954 592 und 970 763, wodurch bestimmte methodische Maßnahmen ein Molekulargewicht des Dextransulfates von vorzugsweise 7500 erreicht wird.

An der Cellulose wurde gefunden, daß die Toxizität ihrer Schwefelsäureester durch Einführung von Carboxymethylgruppen und  $\beta$ -Oxyäthylgruppen vermindert werden kann (schweizerische Patentschrift 235 956).

Allen diesen Verfahren gemeinsam ist die Tendenz, die heparinoide Wirksamkeit durch Einhalten eines optimalen Schwefelgehaltes zu gewährleisten und die damit verbundene Toxizität durch andere Maßnahmen, nämlich Senkung des Molekulargewichtes oder Einführung von Carboxymethyl- bzw.  $\beta$ -Oxyäthylgruppen zu verringern.

Die wenn auch geringe Hemmwirkung neutraler Polysaccharide auf die Gerinnung und ihre mögliche Verstärkung durch andere saure Gruppen als  $\text{SO}_3\text{H}$ -Gruppen fand bisher in dem hier interessierenden Zusammenhang noch keine Beachtung. Aus der Anwendungspraxis von klinischem Dextran, besonders bei postoperativen Indikationen, ist bekanntgeworden, daß die Blutungszeit auffallenderweise verlängert wird (U. Jacobäus, *Acta med. Scand. Suppl.* 322 [1957], S. 93). Die Erscheinung ist für Dextran-Infusionslösungen charakteristisch.

Bei der Überprüfung dieses Phänomens wurde

## Verfahren zur Herstellung von Natriumsalzen blutgerinnungshemmender Dextranschwefelsäureester

Anmelder:

VEB Serum-Werk Bernburg,  
Bernburg/Saale, Hallesche Landstr. 105 b

Dr. Ulrich Behtens, Dr. Manfred Ringfeil  
und Anton Gabert, Leipzig,  
sind als Erfinder genannt worden

## 2

überraschenderweise gefunden, daß es durch Einführung von Carboxyalkylgruppen in das Dextranmolekül erhöht wird.

Bei der Kombination dieses Effektes mit der an sich bekannten blutgerinnungshemmenden Wirkung von Dextransulfaten wurde festgestellt, daß erfindungsgemäß hergestellte Carboxyalkyldextran-Polyschwefelsäureester mit einem wesentlich niedrigeren Schwefelgehalt als analog hergestellte Dextranpolyschwefelsäureester eine gleichwertig starke heparinoide Wirksamkeit ausüben.

Dadurch wird ein nicht bekannter Weg zur Herstellung von Polysaccharid-Polyschwefelsäureestern mit heparinoider Wirkung beschritten. Im spezifischen Falle des Dextrans läßt sich die schwefelenthaltende Komponente, die  $\text{SO}_3\text{H}$ -Gruppe wesentlich verringern und somit die ihr zugeschriebene toxische Wirkung. Der damit verbundene Verlust an gerinnungshemmender Wirksamkeit läßt sich durch Einführung von sauren Gruppen, wie Carboxymethyl-, Carboxyäthyl- und Carboxypropylgruppen ausgleichen.

In der Abbildung sind Ergebnisse dieser Substitution von  $\text{SO}_3\text{H}$ -Gruppen durch saure Gruppen hinsichtlich der Recalsifizierungszeit am Humanplasma dargestellt. Es handelt sich bei diesem Vergleich um zwei Gruppen von Derivaten. Die beiden Gruppen werden jeweils aus den gleichen Ausgangsmaterialien (Dextran) hergestellt. Bei der ersten Gruppe wurde höhermolekulares Dextran (mittleres Molekular-

gewicht 75 000), bei der zweiten Gruppe niedermolekulares Dextran (mittleres Molekulargewicht 30 000) verwendet. Es geht aus den Kurven klar hervor, daß der Verlust an Schwefel durch die Einführung der sauren Carboxymethylgruppen kompensiert bzw. überkompensiert wird. Bei der ersten Gruppe enthält das Carboxymethyldextransulfat 34,9 % Schwefel weniger als das entsprechende Dextransulfat; bei der zweiten Gruppe enthält das Carboxymethyldextransulfat 33,7 % Schwefel weniger als das entsprechende Dextransulfat. Der Substitutionsgrad  $\beta$  (für COOH-Gruppen) liegt beim ersten Carboxymethyldextransulfat bei 0,471, beim zweiten Carboxymethyldextransulfat bei 0,503. Analoge Ergebnisse wurden bei der Messung der Thrombinzeit gefunden. Alle diese Produkte erwiesen sich als nicht toxisch. Der Schwefelgehalt der erfindungsgemäß hergestellten Präparate liegt mindestens um ein Drittel niedriger als der der bekannten wirksamen Präparate.

Es gibt zwei Wege zur Herstellung der Verfahrensprodukte. Man kann die Carboxyalkylierung des Dextrans durchführen und anschließend sulfurieren; es kann aber auch der umgekehrte Weg beschritten werden, d. h., daß man erst die Sulfurierung und dann die Carboxymethylierung durchführt.

### Beispiel 1

#### Herstellung von Carboxymethyldextransulfat-Natrium

a) 200 g Dextran (mittleres Molekulargewicht 75 000) wird mit 630 ml destilliertem Wasser angerührt. Dann werden 630 ml 40%ige Natronlauge zugesetzt und so lange gerührt, bis sich das Dextran vollständig gelöst hat. Danach werden unter Rühren portionsweise 300 g Monochloressigsäure eingetragen. Die Temperatur des Reaktionsgemisches darf dabei nicht über 20° C ansteigen. Man läßt den Ansatz über Nacht stehen und füllt dann mit Methanol das Carboxymethyldextran-Natrium aus. Das Produkt wird durch mehrfaches Umrühren gereinigt. Man erhält 255 g des Natriumsalzes mit einem Substitutionsgrad von 0,471.

b) Zu 800 ml absolutem Pyridin werden unter Rührung und Kühlung mit Methanol-Kohlensäure 180 ml Chlorsulfonsäure getropft. Ordliche Überhitzungen, kennzeichnend durch Verfärbung der gebildeten Pyridiniumsalze, wurden vermieden. Nach Entfernen des Kühlbades werden die ausgeschiedenen Pyridiniumsalze durch Erwärmen auf 60 bis 70° C größtenteils in Lösung gebracht. Dann werden 120 g des getrockneten, fein pulverisierten Carboxymethyldextran-Natriums unter Rühren eingetragen. Die Temperatur wird nacheinander auf 75 bis 80° C gebracht und unter Rühren 4 Stunden beibehalten. Man läßt das Reaktionsgemisch über Nacht bei Zimmertemperatur stehen. Danach wird die Reaktionsmasse in 1 l Eiswasser eingerührt. Die Pyridiniumsalze werden durch Zugabe von 40%iger Natronlauge zersetzt. Das abgeschiedene Pyridin wird abgetrennt, das Natriumsalz des Carboxymethyldextransulfats mit Methanol gefällt, mehrfach umgefällt und dann der Dialyse unterworfen. Das Dialysat wird bei 40 bis 50° C im Vakuum bis zur sirupösen Konsistenz eingedampft. Das sirupöse Produkt wird in Methanol eingerührt, unter Methanol gegebenenfalls zerkleinert, mit Aceton und Äther gewaschen und anschließend getrocknet. Ausbeute an Natriumsalz: 160 g. Der Schwefelgehalt beträgt 10,8 %, bezogen auf das Natriumsalz.

### Beispiel 2

#### Herstellung von Carboxymethyldextransulfat-Natrium

a) 200 g Dextran (mittleres Molekulargewicht 75 000) werden mit 630 ml destilliertem Wasser angerührt. Dann werden 630 ml 40%ige Natronlauge zugesetzt und so lange gerührt, bis sich alles Dextran gelöst hat. Danach werden portionsweise 300 g Monochloressigsäure eingetragen. Die Temperatur des Reaktionsgemisches darf dabei nicht über 20° C steigen. Man läßt den Ansatz 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen und füllt dann das gebildete Carboxymethyldextran-Natrium mit Methanol aus. Das Produkt wird durch mehrfaches Umrühren gereinigt. Man erhält 360 g des Natriumsalzes mit einem Substitutionsgrad von 0,693.

b) Aus 800 ml absolutem Pyridin und 180 ml Chlorsulfonsäure wird analog Beispiel 1 das Pyridiniumsulfurierungsgemisch hergestellt. In die bei 60 bis 70° C größtenteils gelösten Pyridiniumsalze werden 120 g des obigen getrockneten und fein pulverisierten Carboxymethyldextran-Natriums eingebracht und 4 Stunden bei 75 bis 80° C sulfuriert. Die Aufarbeitung des Reaktionsproduktes sowie dessen Reinigung erfolgt analog Beispiel 1. Man erhält 150 g des Natriumsalzes mit einem Schwefelgehalt von 10,4 %.

### Beispiel 3

#### Herstellung von Carboxymethyldextransulfat-Natrium

a) 200 g Dextran (mittleres Molekulargewicht 30 000) werden mit 630 ml destilliertem Wasser angerührt. Dann werden 630 ml 40%ige Natronlauge zugesetzt und bis zur Lösung des Dextrans gerührt. Nachdem sich alles Dextran gelöst hat, werden 300 g Monochloressigsäure portionsweise eingetragen, wobei die Temperatur des Reaktionsgemisches nicht über 20° C steigen darf. Man läßt den Ansatz über Nacht stehen, füllt das gebildete Carboxymethyldextran-Natrium mit Methanol aus und reinigt es durch mehrfaches Umrühren. Man erhält 260 g des Natriumsalzes mit einem Substitutionsgrad von 0,560.

b) Aus 800 ml absolutem Pyridin und 180 ml Chlorsulfonsäure wird analog Beispiel 1 das Pyridiniumsulfurierungsgemisch hergestellt. In die bei 60 bis 70° C größtenteils in Lösung gebrachten Pyridiniumsalze werden 120 g des obigen getrockneten und fein pulverisierten Carboxymethyldextran-Natriums eingetragen und 4 Stunden bei 75 bis 80° C sulfuriert. Die Aufarbeitung des Reaktionsproduktes erfolgt analog Beispiel 1. Man erhält 130 g des Natriumsalzes mit einem Schwefelgehalt von 10,76 %.

### Beispiel 4

#### Herstellung von Carboxypropyldextransulfat-Natrium

a) 200 g Dextran (mittleres Molekulargewicht 13 000) werden mit 644 ml destilliertem Wasser angerührt und mit 644 ml 40%iger Natronlauge versetzt. Nachdem das Dextran unter Rühren vollständig in Lösung gebracht wurde, wurden 528 g p-Brombuttersäure portionsweise eingetragen. Die Temperatur des Reaktionsgemisches wurde auf unter 20° C gehalten. Man

läßt den Ansatz einen Tag stehen und füllt das gebildete Carboxymethyldextran-Natrium mit Methanol aus und reinigt es durch mehrfaches Umfüllen. Ausbeute: 110 g.

b) Aus 665 ml absolutem Pyridin und 150 ml 5 Chlorsulfonsäure wurde analog Beispiel 1 das Pyridiniumsulfurierungsgemisch hergestellt. In die bei 60 bis 70° C größtenteils in Lösung gebrachten Pyridiniumsalze wurden 100 g des getrockneten und fein pulverisierten Carboxypropyldextran-Natriums einge- 10 rührt und anschließend 4 Stunden bei 75 bis 80° C sulfuriert.

Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches sowie dessen Reinigung erfolgt analog Beispiel 1. Man er-

hält 60 g des Natriumsalzes mit einem Schwefelgehalt von 11,3%.

#### PATENTANSPRUCH:

Verfahren zur Herstellung von Natriumsalzen blutgerinnungshemmender Dextranschwefelsäureester, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Dextrane im Molekulargewichtsbereich von 10 000 bis 250 000 in bekannter Weise sowohl mit  $\text{HSO}_3^-$ -abspaltenden Mitteln als auch mit Carboxyalkylhalogeniden derart verestert bzw. veräthert, daß ein Teil der  $\text{SO}_3\text{H}$ -Gruppen — bevorzugt mehr als 30 % — durch Carboxyalkylgruppen ersetzt wird.

Hierzu 1 Blatt Zeichnungen

